牛膝多糖抑制沙门氏菌侵染猪小肠上皮细胞的研究

赵玉蓉　王耀东

（湖南农业大学动物科技学院，湖南畜禽安全生产协同创新中心，长沙 410128）

摘　要：本试验以猪小肠上皮细胞（intestinal porcine epithelial cells-1，IPEC-1）为模型，探讨牛膝多糖（*Achyranthes bidentata* polysaccharides，ABPS）对 IPEC-1 增殖、紧密连接相关蛋白 mRNA 表达和沙门氏菌侵染的影响。在 IPEC-1 细胞培养基中分别加入相应剂量的 ABPS，使培养基中 ABPS 终浓度分别为 0、50、100、200、400 μg/mL。分别采用 MTT 法、实时荧光定量 PCR 法和平板细菌计数法检测 ABPS 对 IPEC-1 的影响。结果表明：1）与对照组相比，ABPS 对 IEPC-1 增殖无显著影响（$P>0.05$）。2）ABPS 处理能显著抑制沙门氏菌的侵染，随着 ABPS 浓度的增加，其抑制效果先增加后减少，浓度为 50 μg/mL 时抑制效果达到峰值，其细胞被侵染的沙门氏菌数量极显著低于对照组、200、400 μg/mL ABPS 组（$P<0.01$）。3）与对照组相比，50、200 μg/mL ABPS 均极显著上调 IEPC-1 紧密连接相关蛋白[Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1（*RAC*1）、细胞质密闭小带-1（*ZO*-1）、Occludin、Claudin-1]mRNA 的相对表达（$P<0.01$）。由此可知，适量的 ABPS 能够通过上调 IEPC-1 紧密连接相关蛋白 mRNA 表达，从而增强小肠黏膜的屏障功能，抑制沙门氏菌的侵染。

关键词：牛膝多糖；沙门氏菌；猪小肠上皮细胞；紧密连接

中图分类号：　　文献标识码：　　文章编号：

肠黏膜屏障可有效地阻挡肠道内微生物及其毒素向肠腔外组织扩散和病原微生物的入侵[1-2]，而其黏膜上皮细胞间良好的紧密连接结构是维持肠黏膜发挥正常屏障功能和吸收功能的前提[3]。研究表明，紧密连接是依靠一系列跨膜及外周蛋白相互作用形成的复合体，包

收稿日期：2018-05-24

基金项目：湖南省自然科学基金(10JJ5015)

作者简介：赵玉蓉(1971-)，女，湖南澧县人，教授，博士，主要从事动物营养与饲料研究。E-mail: 1335434506@qq.com

括跨膜的闭锁蛋白（Occludin）、闭合蛋白（Claudin）和细胞质密闭小带（ZO）1～3 等多种蛋白[4-5]，一旦这些蛋白的表达和定位发生改变，就会诱导宿主细胞骨架重排、连接结构破坏，从而导致细胞通透性升高，对抗原物质的屏障功能减弱，病原体将通过上皮细胞进入机体，引发一系列肠道疾病[6-9]。沙门氏菌是一种革兰氏阴性菌，可以通过诱导吞噬作用侵入肠上皮细胞并在含沙门氏菌液泡中存活和繁殖[10]，在养猪生产过程中，极易感染 2～4 月龄的仔猪，导致仔猪腹泻，甚至死亡[11]。庾庆华[6]研究表明，沙门氏菌 SL1344 和 SARB21 感染人结肠腺癌细胞（Caco-2）后，Occludin，Claudin-1，ZO-1 等蛋白表达下降，分布分散，细胞间隙增大，细胞轮廓不清晰。牛膝多糖（*Achyranthes bidentata* polysaccharides，ABPS）是从苋科植物牛膝中提取、分离、纯化得到的一种生物活性多糖，具有抗氧化、抗肿瘤、提高机体免疫力等系列作用[12]。陈清华[13]研究表明，饲粮中添加适量的 ABPS 能显著抑制肠道病原菌生长，显著降低仔猪腹泻发生率，但这是否与 ABPS 参与调控肠上皮细胞间紧密连接的形成有关目前鲜有报道。因此，本试验旨在以猪小肠上皮细胞（intestinal porcine epithelial cells-1，IPEC-1）为研究对象，人为感染沙门氏菌，探讨 ABPS 处理对沙门氏菌侵染 IPEC-1 的影响，以期为仔猪的健康养殖以及 ABPS 的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料

IPEC-1，沙门氏菌817菌株：均由德州农工大学兽医学院惠赠。

ABPS：购自武汉东康源科技有限公司，纯度99%。

1.2 主要试剂及配制

DMEM/F12细胞培养基、0.25%胰蛋白酶、双抗试剂购自Hyclone公司；胎牛血清（FBS）、细胞冻存液购自Gibco公司；D-Hank’s缓冲液、中性磷酸缓冲液（PBS）购自Biotopped公司；Trizol（Carlsbad，CA，USA）、PrimeScript™ RT reagent Kit With gDNA Eraser（RR047A）和SYBR Premix EX Taq™ Ⅱ（RR820A）试剂盒均购自宝生物（大连）工程有限公司；表皮

生长因子（EGF）、ITS liquid Media Supplement（100 ×）购自Sigma公司。

100 mg/mL ABPS 母液：称取 ABPS 粉末 0.500 g，溶于 5 mL 三蒸水中，0.22 μm 微孔滤膜抽滤器抽滤除菌，分装，－20 ℃保存。

LB 液体培养基：分别称取 10 g 蛋白胨、5 g 酵母提取物、10 g NaCl，加入 950 mL 双蒸水中溶解，用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 到 7.0，定容至 1 L，121 ℃、20 min 高压灭菌，4 ℃储存。

LB 固体培养基：分别称取 10 g 蛋白胨、5 g 酵母提取物、10 g NaCl，加入 950 mL 双蒸水中溶解，用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 到 7.0，定容至 1 L，然后加入 15 g 琼脂粉，121 ℃、20 min 高压灭菌，待冷却至 50～60 ℃时，倒制平板。

基础培养基：95% DMEM/F12培养基+5% FBS+5 μg/L EGF+1‰ ITS+100 U/mL青霉素+100 μg/mL链霉素。

5 mg/m LMTT：称取0.5 g MTT，溶于100 mL PBS中，0.22 μm微孔滤膜抽滤器抽滤除菌，4 ℃避光保存。

1.3 主要方法

1.3.1 细胞培养

IPEC-1 经活化后，培养在基础培养基中，置于 37 ℃，5% CO_2 培养箱中培养。细胞生长至 80%～90%融合后，用 0.25%胰蛋白酶消化，倒置显微镜下计数，收集细胞用于细胞传代或后续试验。

1.3.2 ABPS 对 IPEC-1 增殖的影响

将细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔细胞培养板中，每孔加入 200 μL 基础培养基，37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养，待细胞贴壁后，分别加入相应剂量的 ABPS，使培养基中 ABPS 终浓度分别为 0、50、100、200、400 μg/mL，分别继续培养 12、24、48、72 h（每个时间点每个处理设 6 个重复孔），加入 20 μL MTT，继续培养 4 h，吸弃培养基，加 150 μL 二甲基

亚砜（DMSO），摇床低速振荡 10 min，用酶标仪在 490 nm 波长处测吸光度值（OD 值）。细胞增殖以 OD 值呈现。

1.3.3 沙门氏菌对 IPEC-1 的侵染

① 沙门氏菌的准备：细胞消化分板当天，挑取单个 817 菌落于 5 mL LB 液体培养基中，200 rpm、37 ℃摇床培养过夜（10～12 h），然后取 10 μL 菌液于另一支 5 mL LB 液体培养基中，37 ℃恒温箱培养（20～24 h）,1 000 rpm 离心 10 min，弃上清，用 5 mL 不含抗生素和 FBS 的基础培养基重悬细菌。

② 将细胞以 5×10^4 个/孔接种于 24 孔细胞培养板，每孔加入 1 mL 基础培养基，待细胞贴壁后，分别加入相应剂量的 ABPS，使培养基中 ABPS 终浓度分别为 0、50、100、200、400 μg/mL（每个处理设 5 个重复孔），37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 48 h，吸弃培养基，PBS 润洗 2 次；每孔加入 100 μL 沙门氏菌悬液，1 000 rpm 室温离心 10 min，37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 1 h；吸弃上清液，PBS 润洗 2 次；每孔加入含庆大霉素（100 μg/mL）无 FBS 的培养基 1 mL，37 ℃、5% CO_2 培养箱中继续孵育 2 h；吸弃培养基，PBS 润洗 3 次；每孔加入 200 μL 1% Triton X-100 裂解液，37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 5 min；每孔加入 800 μL PBS，反复吹打，然后移入 1.5 mL 离心管，用 PBS 按 10 倍次方依次稀释。

③ 每个 LB 培养皿（Φ9 cm）中分别接种 100 μL 的上述裂解稀释液（10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}，每个稀释液重复 3 个培养皿），用灭菌棒涂抹均匀，待菌液完全吸收后，倒置于 37 ℃恒温箱培养 18～24 h。

④ 菌落数的计数（CFU/皿）：用计数器计数培养皿中的菌落数。

1.3.4 ABPS 对 IPEC-1 紧密连接蛋白相关基因 mRNA 表达

将细胞以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔细胞培养板中，每孔加入 2 mL 基础培养基，待细胞贴壁后，分别加入相应剂量的 ABPS，根据 1.3.3 侵染结果，本试验培养基中 ABPS 终浓度分别为 0、50、200 μg/mL（每个处理设 5 个重复孔），37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 48 h，

吸弃培养基，PBS 润洗 2 次；每孔加入 1 mL Trizol，按照 Trizol 试剂说明书提取细胞总 RNA。

cDNA 合成：按照 TaKaRa PrimeScript™ RT reagent Kit With gDNA Eraser 操作说明书进行，反应结束后－20 ℃保存备用。引物均由上海生工生物有限公司合成，具体信息见表 1。

表 1　实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1　Primer sequence of real-time fluorescent quantitative PCR

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5'-3')	退火温度 Annealing temperature/℃
Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1 *RAC*1	F: GGGACGAAGCTTGATCTCAG	55.3
	R: GTCGAACACTGTCTTGAGGC	55.9
细胞质密闭小带-1 *ZO*-1	F: AAGCCCTAAGTTCAATCACAATCT	54.5
	R: TCAAACTCAGGAGGCGGC	57.8
闭锁蛋白 Occludin	F: TCCTGGGTGTGATGGTGTTC	57.1
	R: CGTAGAGTCCAGTCACCGCA	58.9
闭合蛋白-1 Claudin-1	F: GCTGGGTTTCATCCTGGCTTCT	59.7
	R: CCTGAGCGGTCACGATGTTGTC	60.2
磷酸甘油醛脱氢酶 *GAPDH*	F: TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG	57.2
	R: CCCTGTTGCTGTAGCCAAATTC	56.6

实时荧光定量 PCR：采用 SYBR Green Ⅰ染料法，按照 SYBR Premix EX Taq™ Ⅱ操作说明书在 CFX96 荧光定量 PCR 仪进行定量分析。反应体系为：10 μL SYBR Premix EX Taq Ⅱ，2 μL 稀释后的 cDNA 模板，上、下游引物（10 μmol/L）各 0.8 μL，ddH$_2$O 6.4 μL，反应程序为 95 ℃ 30 s；95 ℃ 5 s，60 ℃ 40 s，35 个循环；熔解曲线从 60 至 95 ℃逐步升温（每 5 s 增加 0.5 ℃）获得。以磷酸甘油醛脱氢酶(*GAPDH*)基因为内参，采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法进行

目的基因的相对表达量计算。

1.4 数据处理及分析

数据经 Excel 2007 初步整理后，用 SPSS 21.0 统计软件进行单因素方差分析（one-way ANOVA），之后进行 Duncan 氏法多重比较，差异显著水平为 $P<0.05$，极显著水平为 $P<0.01$，结果用平均值±标准差（Mean±SD）表示。

2 结果与分析

2.1 ABPS 对 IPEC-1 增殖的影响

由表 2 可知，用不同浓度 ABPS 分别处理 IPEC-1 细胞 12、24、48、72 h 后检测细胞增殖情况，发现在相同培养时间条件下各组间 IPEC-1 细胞活性均无显著性差异（$P>0.05$）。

表 2 ABPS 对 IPEC-1 增殖的影响

Table 2 Effects of ABPS on IPEC-1 proliferation （n=6）

时间	ABPS 浓度 ABPS concentration/(μg/mL)					*P* 值
Time/h	0	50	100	200	400	*P*-value
12	0.40±0.04	0.35±0.02	0.36±0.03	0.40±0.06	0.38±0.05	0.160 8
24	0.47±0.02	0.49±0.02	0.48±0.03	0.51±0.03	0.49±0.05	0.206 8
48	0.57±0.02	0.55±0.02	0.57±0.02	0.56±0.02	0.55±0.04	0.110 5
72	0.60±0.02	0.59±0.04	0.60±0.05	0.59±0.05	0.61±0.05	0.944 0

同行数据肩标无字母或相同字母表示差异不显著（$P>0.05$），不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$），不同大写字母表示差异极显著（$P<0.01$）。下表同

In the same row, values with no letter or the same letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$), while with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), and with different capital letter superscripts mean significant difference ($P<0.01$). The same as below.

2.2 ABPS 对沙门氏菌侵染 IPEC-1 的影响

由表 3 可知，用不同浓度的 ABPS 处理 IPEC-1 细胞 48 h，然后接种沙门氏菌，发现各组间细胞被侵染的沙门氏菌数量差异极显著（P<0.01）。统计分析结果表明，ABPS 显著抑制沙门氏菌侵染 IPEC-1，其抑制效果呈先增加后下降的趋势。培养基中添加 50 μg/mL ABPS 抑制沙门氏菌侵染 IPEC-1 的效果最强，极显著高于对照组、200、400 μg/mL ABPS 组（P<0.01），与 100 μg/mL ABPS 组的差异不显著（P>0.05）。

表 3　ABPS 对沙门氏菌侵染 IPEC-1 的影响

Table 3　Effects of ABPS on *Salmonella* infecting IPEC-1 (n=5)　　CFU/皿

项目 Item	ABPS 浓度 ABPS concentration/(μg/mL)					P 值
	0	50	100	200	400	P-value
菌落 Folony	45.20±3.70^{Aa}	12.80±2.39^{Cc}	15.00±2.35^{Cc}	22.60±5.03^{Bb}	23.20±4.44^{Bb}	<0.000 1

2.3 ABPS 对 IPEC-1 紧密连接相关蛋白 mRNA 表达的影响

由表 4 可知，不同组间 IPEC-1 紧密连接相关蛋白 *RAC*1、*ZO*-1、Occludin、Claudin-1 mRNA 的相对表达量均存在极显著差异（P<0.01）。与对照组相比，0、200 μg/mL ABPS 均显著上调 *RAC*1、*ZO*-1、Occludin 和 Claudin-1 mRNA 的相对表达量。其中，*RAC*1 mRNA 的相对表达量分别增加 77%、48%；*ZO*-1 mRNA 的相对表达量分别增加 79%、64%；Occludin mRNA 的相对表达量分别增加 125%、81%；Claudin-1 mRNA 的相对表达量分别增加 218%、140%。与 50 μg/mL ABPS 组相比，200 μg/mL ABPS 组的 *RAC*1、Occludin 和 Claudin-1 的 mRNA 相对表达量极显著下降（P<0.01）。

表 4　ABPS 对 IPEC-1 紧密连接相关蛋白 mRNA 相对表达量的影响

Table 4　Effects of ABPS on related expression levels of tight junction proteins in IPEC-1　(n=5)

项目	ABPS 浓度 ABPS concentration/(μg/mL)			P 值
Items	0	50	200	P-value
Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1 *RAC*1	1.00±0.05^{Cc}	1.77±0.20^{Aa}	1.48±0.14^{Bb}	<0.000 1

细胞质密闭小带-1 *ZO*-1	1.01±0.09^{Bb}	1.81±0.17^{Aa}	1.66±0.16^{Aa}	<0.000 1
闭锁蛋白 Occludin	1.07±0.11^{Cc}	2.41±0.37^{Aa}	1.94±0.20^{Bb}	<0.000 1
闭合蛋白-1 Claudin-1	1.04±0.08^{Cc}	3.31±0.29^{Aa}	2.50±0.36^{Bb}	<0.000 1

3 讨论

大量研究表明，ABPS 对肠道功能有改善作用，并且可以改善免疫系统。秦文雅[14]研究表明，ABPS 可以改善 LPS 应激对肠道吸收功能以及免疫功能的影响。李孟伟[15]研究表明，细胞培养基中添加 300～1 200 μg/mL 的 APBS 能够显著地促进猪肠上皮细胞（IPEC-J2）的增殖，并且适宜的 ABPS 对 IPEC-J2 生长有一定的保护作用。本试验结果表明，与对照组相比，ABPS 对 IPEC-1 的增殖无显著影响。

沙门氏菌是一种革兰氏阴性菌，通常在动物肠道内感染，也会通过污染食物引起人类食物中毒。在各类细菌引起的食物中毒中，沙门氏菌中毒是最为常见疾病之一[16]。在养猪生产过程中，由于仔猪的肠道功能发育不完善、免疫能力低下，沙门氏菌极易感染 2～4 月龄的仔猪，致使仔猪体温升高、精神不振、长时间发生腹泻、生长发育缓慢、停滞等，严重时发生败血症，最终导致仔猪死亡[11,17]。本研究结果表明，ABPS 预处理的 IPEC-1 细胞能显著抵抗沙门氏菌的侵染，此现象与陈清华[13]、马杰等[18]的报道相似，即饲粮中添加适量的 ABPS 能显著抑制断奶仔猪肠道病原菌的生长，一定剂量的 ABPS 在体外有抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的效果。

小肠上皮细胞间良好的紧密连接结构是维持小肠黏膜发挥正常屏障功能和吸收功能的前提。而紧密连接是依靠一系列跨膜及外周蛋白相互作用形成的复合体，其功能依赖于细胞连接蛋白、细胞骨架蛋白的正常表达和分布以及黏附连接的完整性。一旦这些蛋白的表达和定位发生改变就会导致细胞结构受损、通透性增高，各种病原菌及毒素经肠黏膜进入血液循

环，引起肠道炎症[19-21]。庾庆华[6]体外（Caco-2 细胞单层模型）和体内（大鼠）试验均表明，沙门氏菌 SL1344 和 SARB21 感染后，Occludin、Claudin-1 和 ZO-1 等蛋白的分布较正常组分散，表达显著下降，细胞间隙增大，细胞轮廓不清晰。RAC1 广泛表达于多种组织细胞内，在维持、增强和恢复内皮细胞屏障功能中发挥着重要的作用[22]。机体生理情况下基础水平的 RAC1 活性在细胞黏着连接和细胞骨架结构形成及维持两者连接上起着重要作用[23]。研究表明，运用 RAC1 抑制剂干扰抑制 RAC1 的活化，将导致黏着连接复合体的破坏以及细胞骨架肌动蛋白之间连接的破坏[24-26]。本研究结果表明，培养基中添加 ABPS，能显著上调 IPEC-1 细胞紧密连接相关蛋白（*RAC*1、*ZO*-1、Occludin、Claudin-1）mRNA 的相对表达量，显著抑制沙门氏菌的侵染，这说明 ABPS 能通过促进小肠上皮细胞紧密连接相关蛋白 mRNA 表达，维持肠道黏膜结构的完整，从而抑制病原菌的侵染。

4 结 论

在本试验条件下：

① ABPS 在 0～400 μg/mL 范围内对 IEPC-1 的增殖无显著的影响。

② ABPS 处理后的 IEPC-1 能显著抑制沙门氏菌的侵染，随着 ABPS 浓度的增加，其抑制效果呈先增加后降低的变化。

③ 50、200 μg/mL ABPS 可以显著上调 IEPC-1 紧密连接相关蛋白 mRNA 的相对表达量。

参考文献：

[1] DEITCH E A.Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut:what is important in human beings[J].Surgery,2002,131(3):241–244.

[2] ZHOU Y,YUAN H R,CUI L,et al.Effects of visfatin on the apoptosis of intestinal mucosal cells in immunological stressed rats[J].Acta Histochemica,2017,119(1):26–31.

[3] TANG X P,LIU H,YANG S F,et al.Epidermal growth factor and intestinal barrier

function[J].Mediators of Inflammation,2016,2016:1927348.

[4] GONZÁLEZ-MARISCAL L,NAVA P,HERNÁNDEZ S.Critical role of tight junctions in drug delivery across epithelial and endothelial cell layers[J].Journal of Membrane Biology,2005,207(2):55–68.

[5] SUZUKI T.Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions[J].Cellular and Molecular Life Sciences,2013,70(4):631–659.

[6] 庾庆华.肠上皮细胞紧密连接调节的研究[D].博士学位论文.南京:南京农业大学,2009.

[7] WANG B,WU G Y,ZHOU Z G,et al.Glutamine and intestinal barrier function[J].Amino Acids,2015,47(10):2143–2154.

[8] 吴姚平,武晓丽,徐锋,等.鼠伤寒沙门氏菌对肠道屏障的破坏作用[J].南昌大学学报:理科版,2017,41(3):265–269.

[9] SHIFFLETT D E,CLAYBURGH D R,KOUTSOURIS A,et al.Enteropathogenic *E. coli* disrupts tight junction barrier function and structure *in vivo*[J].Laboratory Investigation,2005,85(10):1308–1324.

[10] BHUNIA A K.Salmonella enterica[M]//BHUNIA A K ed.Foodborne Microbial Pathogens.New York:Springer,2018,271–287.

[11] 张娜.猪沙门氏菌病的流行病学、临床表现、诊断和防控[J].现代畜牧科技,2017(4):86.

[12] 陈清华,刘祝英,贺建华.牛膝多糖的生物学功能及作用机制研究进展[J].饲料研究,2008(9):8–11.

[13] 陈清华.牛膝多糖对猪的营养效应和免疫调控机理研究[D].博士学位论文.长沙:湖南农业大学,2008.

[14] 秦文雅.牛膝多糖对免疫应激仔猪肠道的影响及其作用机理[D].硕士学位论文.长沙:湖南农业大学,2012.

[15] 李孟伟.牛膝多糖调控仔猪肠上皮细胞免疫应激及其机理[D].硕士学位论文.长沙:湖南农业大学,2016.

[16] 朱奇,陆斌兴,覃有泉,等.沙门氏菌生物学研究进展[J].疾病监测与控制,2015(7):474–478.

[17] URIBE J H,COLLADO-ROMERO M,ZALDÍVAR-LÓPEZ S,et al.Transcriptional analysis of porcine intestinal mucosa infected with *Salmonella typhimurium* revealed a massive inflammatory response and disruption of bile acid absorption in ileum[J].Veterinary Research,2016,47:11.

[18] 马杰,李孟伟,王雄,等.牛膝多糖体外抑菌效果的研究[J].饲料研究,2017(20):32–34,28.

[19] BALKOVETZ D F,KATZ J.Bacterial invasion by a paracellular route:divide and conquer[J].*Microbes and Infection*,2003,5(7):613–619.

[20] CHEN Y,LI D F,DAI Z L,et al.L-methionine supplementation maintains the integrity and barrier function of the small-intestinal mucosa in post-weaning piglets[J].Amino Acids,2014,46(4):1131–1142.

[21] CAPALDO C T,POWELL D N,KALMAN D.Layered defense:how mucus and tight junctions seal the intestinal barrier[J].Journal of Molecular Medicine,2017,95(9):927–934.

[22] WOJCIAK-STOTHARD B,TSANG L Y F,PALEOLOG E,et al.Racl and RhoA as regulators of endothelial phenotype and barrier function in hypoxia-induced neonatal pulmonary hypertension[J].American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology,2006,290(6):L1173–L1182.

[23] PREDESCU D,PREDESCU S,SHIMIZU J,et al.Constitutive eNOS-derived nitric oxide is a determinant of endothelial functional integrity[J].American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology,2005,289(3):L371–L381.

[24] LAMPUGNANI M G,ZANETTI A,BREVIARIO F,et al.VE-cadherin regulates endothelial actin activating Rac and increasing membrane association of Tiam[J].Molecular Biology of the Cell,2002,13(4):1175–1189.

[25] LIU Z,TAN J L,COHEN D M,et al.Mechanical tugging force regulates the size of cell-cell junctions[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2010,107(22):9944–9994.

[26] NORITAKE J,FUKATA M,SATO K,et al.Positive role of IQGAP 1,an effector of Rac1,in actin-meshwork formation at sites of cell-cell contact[J].Molecular Biology of the Cell,2004,15(3):1065–1076.

Study on Inhibitory Effects of *Achyranthes bidentata* Polysaccharides on *Salmonella* infection in Intestinal Porcine Epithelial Cells-1

ZHAO Yurong　WANG Yaodong

(*College of Animal Science and Technology*, *Hunan Agriculture University*, *Hunan Co-Innovation Center of Animal Production Safety*, *Changsha* 410128, *China*)

Abstract: This experiment was conducted to evaluate the effects of *Achyranthes bidentata* polysaccharides (ABPS) on proliferation, mRNA expression of tight junction related proteins and infection of *Salmonella* in intestinal porcine epithelial cells-1 (IPEC-1). Adding ABPS in IPEC-1 culture medium, the final concentration of ABPS were 0, 50, 100, 200, 400 μg/mL. The effects of ABPS on IPEC-1 were detected using MTT assay, quantitative real-time PCR and plate colony counting method. The results showed as follows: 1) compared with the control group, ABPS had no significant effect on IPEC-1 (P>0.05). 2) The ABPS significantly inhibited *Salmonella*

infection in IPEC-1, with the increase of ABPS concentration, the number of infected *Salmonella* decreased first and then increased. The number of infected *salmonella* in IPEC-1 treated with 50 μg/mL ABPS was the lowest among all groups, and was significantly lower than that in control group and 200 and 400 μg/mL of ABPS groups (P<0.01). 3) Compared with the control group, 50 and 200 μg/mL of ABPS significantly up-regulated the mRNA expression of tight junction associated proteins (ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, Zonula occluden-1, Occludin, Claudin-1) in IEPC-1 (P<0.01). Above results indicate that suitable ABPS can promote IEPC-1 proliferation, strengthen the barrier function of intestinal mucosa and inhibit *Salmonella* infection with up-regulation the mRNA expression of tight junction associated proteins.

Key words: *Achyranthes bidentata* polysaccharides; *Salmonella*; intestinal porcine epithelial cells-1; tight junction

Author, ZHAO Yurong, professor, E-mail: 1335434506@qq.com （责任编辑　陈　鑫）